

小麦 B-ARR 转录因子家族基因鉴定与表达模式分析

王长彪¹, 尹誉蓉¹, 程泽¹, 任永康¹, 牛瑜琦¹, 刘江², 韩斌², 杨晟¹, 唐朝晖¹

(¹山西农业大学农学院, 太原 030031; ²山西农业大学生命科学学院, 太原 030031)

摘要: B型反应调节因子(B-ARR)家族基因是细胞分裂素信号转导的正向调节因子, 在植物生长发育和抗非生物胁迫中起重要作用。然而, 目前对小麦中 B-ARR 基因家族的研究还很少。本研究从小麦基因组中鉴定出 25 个 B-ARR 基因家族成员, 利用生物信息学方法分析其理化性质、基因结构、顺式作用元件和非生物胁迫诱导的表达模式。结果表明, B-ARR 蛋白都定位于细胞核中, B-ARR 蛋白二级结构以 α 螺旋和无规则卷曲为主要结构。B-ARR 基因在小麦染色体上分布不均匀, 7 号染色体上含有的 B-ARR 基因数量最多。此外, 在 B-ARR 的启动子区域中鉴定出了与生长发育、激素响应以及生物和非生物胁迫相关的多种顺式作用调节元件。qRT-PCR 分析表明, 基因 *TaARRM-like9*、*TaARRM-like10*、*TaARRM-like12* 和 *TaARRM-like13* 在干旱、盐和低温胁迫下表达量显著上调, 能够响应非生物胁迫。本研究为进一步研究 B-ARR 转录因子在小麦发育和非生物胁迫应答中的作用奠定了基础。

关键词: 小麦; B-ARR 转录因子; 生物信息学分析; 非生物胁迫; 表达分析

Genome Identification and Expression Analysis of B-ARR

Transcription Factors Family in Wheat

WANG Changbiao², YIN Yurong¹, CHENG Ze¹, REN Yongkang¹, NIU Yuqi¹, LIU Jiang², HAN Bin², YANG Sheng¹, TANG Chaohui¹

(¹College of Agricultural, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031; ²College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031)

Abstract: The type-B authentic response regulator (B-ARR) family members are positive regulators in cytokinin signal transduction, and play important roles in plant growth and development and resistance to abiotic stresses. However, there are few studies on the B-ARR gene family in wheat. In this study, 25 B-ARR gene family members were identified from wheat genome, and their physicochemical properties, gene structure, cis-acting elements and abiotic stress-induced expression patterns were analyzed by bioinformatics methods. The results showed that all B-ARR proteins were localized in the nucleus based on bioinformatics prediction, and their secondary structure was mainly consisting of α -helix and random crimp. B-ARR genes were not evenly distributed on wheat chromosomes, and the number of B-ARR genes was the highest on chromosome 7. In addition, multiple cis-acting regulatory elements related to growth and development, hormone response, and biological and abiotic stress have been identified in the promoter regions. qRT-PCR analysis showed that the relative expression of *TaARRM-like9*, *TaARRM-like10*, *TaARRM-like12* and *TaARRM-like13* were significantly up-regulated under abiotic stresses treatments, including drought, salt and low temperature. This study laid a foundation for further research on the role of B-ARR transcription factor in wheat development and abiotic stress response.

Key words: wheat; B-ARR gene family; bioinformatics analysis; abiotic stress; expression analysis

收稿日期:

第一作者研究方向为作物分子设计育种, E-mail:wcbksl@126.com;尹誉蓉为共同第一作者

通讯作者: 唐朝晖, 研究方向为小麦种质资源创制, E-mail:tzhhui126@126.com

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1200901); 山西省重点研发计划项目(202102140601001); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金(2023CYJSTX02-06)

Foundation projects: National Key R&D Program of China(2022YFD1200901); Shanxi Provincial Key R&D Program(202102140601001); Shanxi Province modern agricultural industry technology system construction special fund (2023CYJSTX02-06)

小麦是全球种植最广泛的作物,种植面积 30-33 亿亩(国际粮农组织 FAO, <https://www.fao.org/faostat/zh>),它是全球 1/3 以上人口的主食。我国小麦的种植面积为 3.5 亿亩,自 2015 年以来,年总产超过 1.3 亿吨(国家统计局, <https://data.stats.gov.cn/index.htm>),是世界上最大的小麦生产国。然而,近些年来全球气候变化影响了小麦的产量,迫切需要新的品种,这是小麦育种面临的挑战^[1,2]。小麦主要含有淀粉、蛋白质、脂肪以及磷、锌、铁等矿物质。另外,小麦中含有大量的可溶性纤维和不溶性纤维。小麦育种从 20 世纪初开始,经过几代育种家的努力,普通小麦育种技术已经比较成熟,小麦品种的选育已由传统的以量取胜转为以质为先,把品质放在了首位。但抗逆新品种数量的增加速度较慢,不能满足生产发展的需要。因此,对于小麦的基础研究非常重要,尤其是抗逆基因的挖掘。本研究对小麦生长发育相关的 B-ARR 转录因子家族进行了深入分析,为小麦抗逆高产品种选育提供理论依据。

高等植物转录因子的研究在功能基因组学研究中具有重要意义。高温、干旱、低温和盐等非生物胁迫对植物的生长发育有重要影响。一些转录因子通过与其靶启动子中的特定 DNA 序列结合来调节其靶基因在应激下的转录水平^[3-5]。转录因子占植物特异性蛋白质的 13%^[6]。基于其 DNA 结合域的特征,转录因子已被分类为一系列家族,例如 MYB、AP2/EREBP、ARR、GRAS、MADS、WRKY、SBP 等^[6]。其中,B 型反应调节因子(B-ARR)广泛存在于植物中,在介导细胞分裂素信号转导中起非常重要的作用^[7]。在拟南芥中,B-ARR 还和钠的积累、根的伸长、愈伤组织的形成、盐胁迫和冷胁迫耐受性有关^[8]。

细胞分裂素是一种植物激素,它通过控制数千个下游基因的表达来调节广谱的植物生理学,例如细胞分裂、生长和衰老^[9-12]。细胞分裂素在植物形态建成和作物产量中起着至关重要的作用,提高我们对作物细胞分裂素的理解对于促进农业发展至关重要^[13]。已有研究表明,细胞分裂素经过多步磷酸传递将信号从受体传递到细胞核,最终激活 B 型反应调节因子(B-ARR)^[14],其可能调节 B-ARR 家族成员的结合活性^[15],此外在细胞分裂素信号通路中,B 型 ARR 转录因子作为初级转录因子,调节数千个参与细胞分裂素反应的靶基因^[14,16,17]。拟南芥具有 11 个 B 型 ARR 转录因子家族成员,其在受体和转录激活结构域中具有高度序列相似性^[18]。在 11 种转录因子中,ARR 1、10 和 12 被认为是必需的,因为 B 型 ARR 1、10、12 的三重突变体在很大程度上消除了细胞分裂素依赖性基因表达和生理效应^[19,20]。此外,ARR10 和 ARR12 还参与细胞分裂素介导的拟南芥根系原生木质部分化。

在目前的研究中,小麦 B-ARR 转录因子基因家族的研究尚未有详细报道,其生物学功能还有待阐明。因此我们利用生物信息学分析了 B-ARR 基因在小麦中全基因组中的数量,并且对其理化性质、基因结构、顺式作用元件和非生物胁迫诱导的表达模式进行了分析。

1 材料与方法

1.1 小麦 B-ARR 基因家族成员的鉴定

从 PIR 数据库中(<https://proteininformationresource.org/cgi-bin/ipcSF?id=PIRSF036392>)下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)的 14 个 B-ARR 基因家族蛋白序列作为种子序列^[21,22]。从 Ensembl Plants 数据库(<https://plants.ensembl.org/index.html>)中下载小麦(*Triticum aestivum* L.,*Ta*)全基因组序列、蛋白序列和 CDS 序列(RefSeq v2.0)。以 B-ARR 的种子序列为查询序列,利用 BLASTp(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, E-value $\leq 1e^{-5}$)程序比对小麦全基因组序列获得同源序列。使用 InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro>)、NCBI CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)和 HMM Scan(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>)对获得的 B-ARR 基因家族同源序列进行结构域鉴定(PF00072 和 PF00249)。利用 ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)计算小麦 B-ARR 的蛋白长度、分子量、等电点、不稳定系数、脂溶指数和亲水指数。分别利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html)和 BUSCA(<http://busca.biocomp.unibo.it/>)预测 B-ARR 的二级结构和亚细胞定位,使用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive#sequence>)创建 B-ARR 的三维蛋白质结构。

1.2 小麦 B-ARR 基因系统发育分析、基因结构和基序分析

使用 MEGA X 中的 ClustalW^[23] 比对来自几个物种的全长蛋白质序列, 使用邻接法(NJ)^[24] 构建系统发育树(bootstrap 值为 1000; 基序, 10)^[25]。使用 GSDS 在线网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制 B-ARR 基因结构图。为了预测 B-ARR 的保守基序, 我们使用基于基序的序列分析网站 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)分析 B-ARR 蛋白序列中的保守基序, 最大基序数设置为 10。

1.3 小麦 B-ARR 基因的染色体定位、基因重复和共线性分析

从下载的小麦全基因组中获取 B-ARR 的基因组位置, 并利用 Mapchart 软件绘制基因在染色体上的分布。McscanX 软件^[26]用于研究 B-ARR 基因家族内的串联和片段重复以及来自六倍体小麦和其祖先乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu* L., Tu, AA)、拟斯卑尔脱山羊草 (*Aegilops speltoides* L., As, BB, <https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh/Assembly/24530/show>)、粗山羊草 (*Aegilops tauschii* L., Aet, DD) 和四倍体圆锥小麦 (*Triticum turgidum* L., Tt, AABB) 基因组(<https://plants.ensembl.org/index.html>)上 B-ARR 之间的共线性。使用 TBtools^[27] 计算非同义替换率(Ka)、同义替换率(Ks)和 Ka/Ks 比值。

1.4 小麦 B-ARR 基因的顺式作用调控元件分析和蛋白质互作网络分析

利用蛋白序列、gff 文件及全基因序列, 提取 25 个 B-ARR 基因上游 2000bp 序列, 并提交至在线软件 PlantCARE(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)以查找启动子顺式作用元件。随后, 使用 TBtools 进行数据可视化。使用 STRING 在线服务器(<http://string-db.org>)预测 B-ARR 的蛋白质互作网络, 并使用软件 Cytoscape 进行可视化。

1.5 小麦 B-ARR 基因在不同组织部位以及非生物胁迫下的表达模式分析

使用 expVIP 数据库(<http://www.wheat-expression.com/>)下载 B-ARR 在不同时期、组织以及干旱、热胁迫下的表达数据, 并使用 TBtools 软件绘制热图, 分析其表达模式。

1.6 小麦 B-ARR 转录因子家族部分基因在非生物胁迫下的 qRT-PCR 验证

以小麦品种中麦 175(山西农业大学农学院提供)为试验材料, 研究了 B-ARR 在非生物胁迫(干旱胁迫、盐胁迫、低温胁迫)处理下的表达。将籽粒饱满的种子用 75%乙醇消毒处理, 用蒸馏水冲洗干净, 使用 Hoagland 营养液培养, 每两天更换一次营养液。幼苗在 23°C/18°C(白天/黑夜)的人工气候箱(16 h 光照/8 h 黑暗)中生长。当小麦植物生长至二叶一心期, 分别在营养液中添加 PEG-6000 和 NaCl, 其浓度分别是 20%和 25%, 对二叶一心期幼苗进行干旱和盐胁迫处理, 并在处理后 0、3、6、12 和 24 小时分别取 0.1 g 新鲜叶片。对于低温胁迫, 将二叶一心期幼苗置于 4°C冰箱中, 并在处理后 0、3、6、12 和 24 小时分别取 0.1 g 新鲜叶片。上述实验中的每一个处理设置 3 次重复, Hoagland 营养液处理作为对照。采集的叶片立即在液氮中冷冻, 并储存在 -80°C 的冰箱中用于下一步 RNA 提取。使用 TransZolTM Up 试剂盒提取各个样本的总 RNA, 合成 cDNA, 使用 WheatOmics1.0 PrimersServer 数据库(<http://202.194.139.32/PrimerServer/>)设计基因特异性引物(表 1), 使用特异性引物进行 Real-time PCR 分析。使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix 对 B-ARR 基因家族进行 RT-qPCR 检测其在不同样品中的表达量, 全程于冰上加样, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量^[28]。

表1 部分B-ARR基因荧光定量特异性引物

Table 1 Some primers for qRT-PCR of B-ARR gene

基因ID	上游引物	下游引物
Gene ID	Forward primer	Reverse primer
<i>TraesCS4B02G240100.1</i>	TCGCAAGAGGAGCCAAACAT	AACGGGTAGTCCGTCGTTTC
<i>TraesCS6A02G146200.1</i>	CAAGCTTTGGCTGCTTCAGG	GCTGTTTTGGGGTAATGCCG
<i>TraesCS4D02G239900.1</i>	TGGAGCTGAGGATAGCTGGA	CTGGCGACGTTTTCCCTAGT
<i>TraesCS6B02G174400.1</i>	AGAAAGGGCCGAATGCTGAA	AGCTCCACAGACCACACAAC

<i>TraesCS6D02G342200.1</i>	GCTTGTGGGGCTTGAAATGG	CCGCACTGGTGGCTTATTG
<i>TraesCS6D02G135500.1</i>	AGCAACGACGCAGTAAGTCA	TCTGGTGGCAATGAACTGCT

2 结果与分析

2.1 小麦 B-ARR 基因家族成员的鉴定

拟南芥、水稻和玉米 B-ARR 蛋白作为参考序列在小麦基因组数据库中检索。通过 BLAST、HMM、InterPro、NCBI CDD 和 SMART 分析,最终鉴定了 25 个小麦 B-ARR 基因(表 1),将 25 个基因家族成员分别命名为 *TaARRMlike1-TaARRMlike25*。小麦 B-ARR 基因家族的成员通过 ProtParam tool 分析其蛋白质理化性质并进一步注释。B-ARR 的蛋白质长度为 502~684 个氨基酸。B-ARR 的分子量范围为 55.98~73.66,并且根据预测的等电点值,范围为 5.29~8.34,发现 1 个蛋白是碱性的(>7),24 个蛋白是酸性的(<7)。

利用 ProtParam tool 计算了脂溶指数和不稳定系数。脂溶指数为 69.05~84.07,不稳定系数为 36.97~54.16。25 个基因中,4 个基因是稳定的(不稳定指数<40),其余 B-ARR 基因是不稳定的(不稳定指数>40)^[29]。B-ARR 的亲水指数范围为-0.624~-0.305,表明它们是亲水的,可以更好地与水相互作用^[29]。B-ARR 蛋白由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲 4 种二级结构元件组成,其中 α 螺旋和无规则卷曲为主要结构。B-ARR 的亚细胞定位预测显示,B-ARR 家族成员全部位于细胞核中。

表 2 小麦 B-ARR 转录因子家族成员基本信息

Table 2 Basic information of wheat B-ARR transcription factors

基因名	基因 ID	氨基酸长度	分子量	等电点	不稳定系数	脂溶指数	亲水指数	α 螺旋	延伸链	β 折叠	无规则卷曲	亚细胞定位
Gene name	Gene ID	Length of amino acids	Molecular weight (kD)	Isoelectric point	Instability coefficient	Aliphatic index	GRAVY	α -helix (%)	Extending chain (%)	β -folding (%)	Random crimp (%)	Subcellular localization
<i>TaARRM-like1</i>	<i>TraesCS3A02G391600.1</i>	584	64.91	5.34	54.16	76.11	-0.438	25.51	12.16	2.91	59.42	nucleus
<i>TaARRM-like2</i>	<i>TraesCS3A02G473600.1</i>	571	64.06	5.99	44.77	71.37	-0.581	25.04	11.38	4.55	59.02	nucleus
<i>TaARRM-like3</i>	<i>TraesCS3B02G423600.1</i>	584	64.86	5.29	52.82	76.27	-0.418	25.68	13.87	2.91	57.53	nucleus
<i>TaARRM-like4</i>	<i>TraesCS3B02G517000.1</i>	571	63.95	5.75	47.07	70.37	-0.544	27.67	10.86	4.90	56.57	nucleus
<i>TaARRM-like5</i>	<i>TraesCS3D02G384500.1</i>	584	64.83	5.29	53.74	76.44	-0.423	26.03	13.18	3.25	57.53	nucleus
<i>TaARRM-like6</i>	<i>TraesCS4A02G063100.1</i>	684	73.66	6.20	47.16	75.28	-0.436	22.95	13.01	5.56	58.48	nucleus
<i>TaARRM-like7</i>	<i>TraesCS4B02G240100.1</i>	684	73.61	6.16	47.10	75.41	-0.434	21.93	13.74	4.09	60.23	nucleus
<i>TaARRM-like8</i>	<i>TraesCS4D02G239900.1</i>	684	73.60	6.16	47.52	75.15	-0.443	21.93	11.26	4.68	62.13	nucleus
<i>TaARRM-like9</i>	<i>TraesCS6A02G146200.1</i>	619	67.06	6.11	36.97	72.60	-0.606	18.26	10.82	4.20	66.72	nucleus
<i>TaARRM-like10</i>	<i>TraesCS6B02G174400.1</i>	622	67.35	6.07	38.65	72.09	-0.624	20.58	12.86	3.70	62.86	nucleus
<i>TaARRM-like11</i>	<i>TraesCS6B02G392000.1</i>	674	72.58	6.20	49.10	77.73	-0.318	25.96	12.02	3.86	58.16	nucleus
<i>TaARRM-like12</i>	<i>TraesCS6D02G135500.1</i>	624	67.47	6.11	39.16	72.80	-0.610	21.31	12.18	4.49	62.02	nucleus
<i>TaARRM-like13</i>	<i>TraesCS6D02G342200.1</i>	675	72.68	6.08	50.65	77.32	-0.322	24.30	13.19	4.15	58.37	nucleus
<i>TaARRM-like14</i>	<i>TraesCS7A02G146400.1</i>	614	67.30	6.27	42.51	81.48	-0.357	25.41	13.19	4.89	56.51	nucleus
<i>TaARRM-like15</i>	<i>TraesCS7A02G146500.1</i>	605	66.37	6.13	45.15	82.26	-0.308	25.95	11.90	4.30	57.85	nucleus
<i>TaARRM-like16</i>	<i>TraesCS7A02G146700.1</i>	659	72.31	5.84	46.41	82.29	-0.341	26.56	11.53	4.55	57.36	nucleus
<i>TaARRM-like17</i>	<i>TraesCS7A02G502300.1</i>	567	62.86	8.34	44.19	72.20	-0.567	27.16	11.82	4.76	56.26	nucleus
<i>TaARRM-like18</i>	<i>TraesCS7B02G049000.1</i>	624	68.47	6.32	41.28	81.12	-0.366	27.24	12.34	6.09	54.33	nucleus
<i>TaARRM-like19</i>	<i>TraesCS7B02G049200.1</i>	657	71.55	5.76	46.28	81.64	-0.305	25.72	12.18	4.11	57.99	nucleus
<i>TaARRM-like20</i>	<i>TraesCS7B02G408700.1</i>	630	69.52	5.60	47.82	75.19	-0.536	28.10	14.60	7.46	49.84	nucleus
<i>TaARRM-like21</i>	<i>TraesCS7B02G422000.1</i>	563	63.07	5.88	52.60	71.67	-0.538	27.35	11.01	5.15	56.48	nucleus
<i>TaARRM-like22</i>	<i>TraesCS7D02G148000.1</i>	601	66.31	5.81	42.68	82.95	-0.363	28.79	13.14	4.33	53.74	nucleus
<i>TaARRM-like23</i>	<i>TraesCS7D02G148200.1</i>	659	72.02	5.92	49.59	84.07	-0.311	27.31	11.99	4.10	56.60	nucleus
<i>TaARRM-like24</i>	<i>TraesCS7D02G489600.1</i>	502	55.98	5.91	45.06	72.27	-0.605	36.65	10.76	6.37	46.22	nucleus
<i>TaARRM-like25</i>	<i>TraesCS7D02G525900.1</i>	579	64.10	5.86	39.61	69.05	-0.555	29.19	11.40	6.04	53.37	nucleus

使用 SWISS-MODEL 创建 B-ARR 的三维蛋白质结构, 其中基因 *TaARRM-like1*、*TaARRM-like3* 和 *TaARRM-like5*, 基因 *TaARRM-like2* 和 *TaARRM-like4*, 基因 *TaARRM-like6* 和 *TaARRM-like7*, 基因 *TaARRM-like9* 和 *TaARRM-like12*, 基因 *TaARRM-like11* 和 *TaARRM-like13*, 基因 *TaARRM-like16* 和 *TaARRM-like23*, 基因 *TaARRM-like17* 和 *TaARRM-like20* 分别具有相似的三维蛋白质结构模型(图 1)。

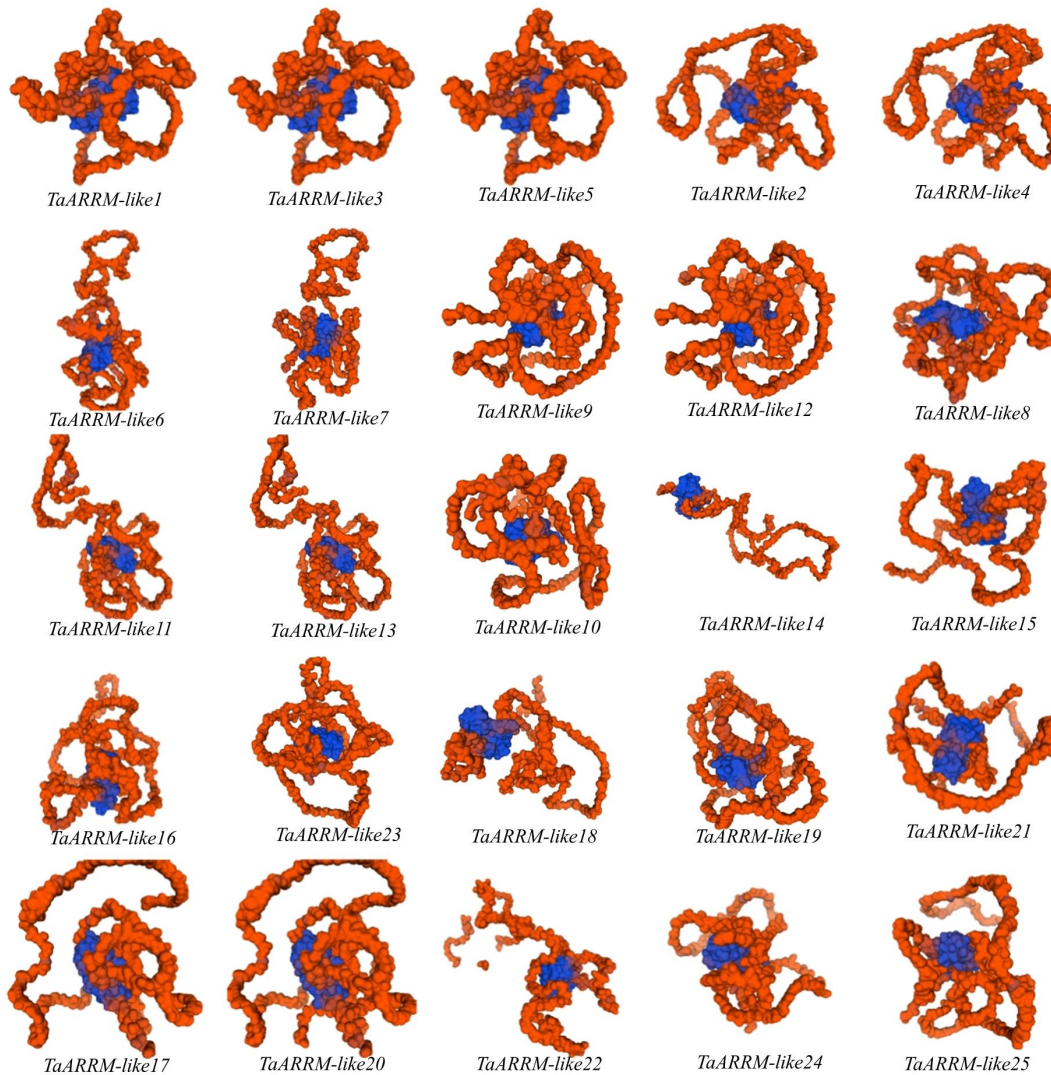
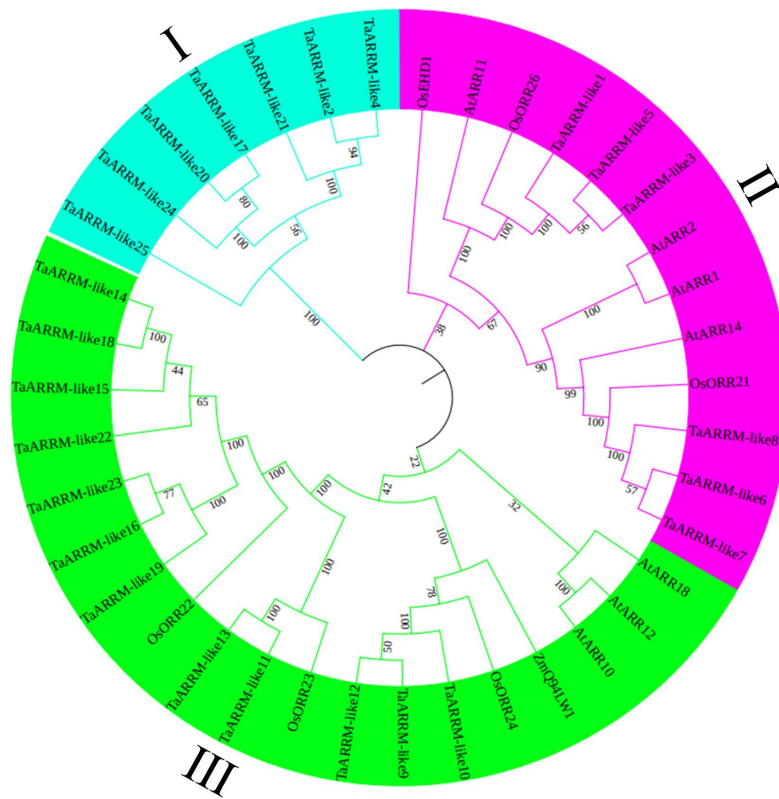


图 1 B-ARR 基因家族的三维蛋白质结构

Fig.1 3D structure of the B-ARR gene family

2.2 小麦 B-ARR 基因家族成员的进化、基因结构和保守结构域分析

为了进一步了解小麦和其他植物物种的 B-ARR 的进化关系和系统发育, 我们使用 MEGAX 构建了来自 4 个植物物种的 B-ARR 蛋白序列系统发育树(图 2)。系统发育树结果表明(图 2), B-ARR 蛋白被分成 3 个进化枝。分支 I 只有小麦 B-ARR 基因分布, 不存在其它物种 B-ARR 基因, 这说明分支 I 中的这 7 个小麦基因可能与其它物种的同源性较低。分支 II 中有 6 个小麦 B-ARR 基因, 分支 III 是最大分支, 有 12 个小麦 B-ARR 基因, 其中 *TaARRM-like11*、*TaARRM-like13* 和 *OsORR23* 同在一个小分支上, 说明这 2 个小麦 B-ARR 基因与水稻 *OsORR23* 具有较高的同源性, 在功能上可能也具有相似性。



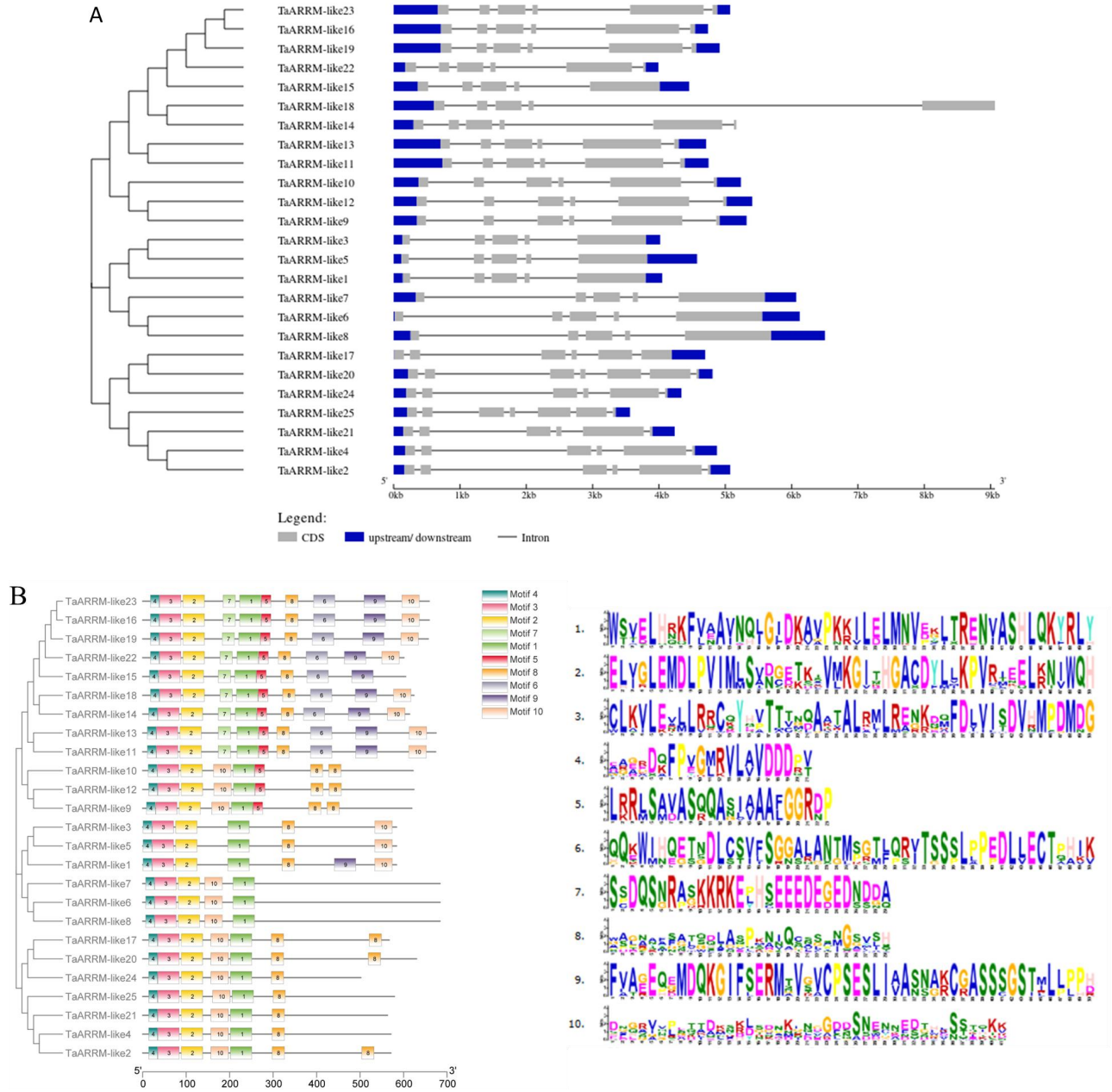
Ta: 小麦; Zm: 玉米; Os: 水稻; At: 拟南芥;
 Ta: *T.aestivum*; Zm: *Z.mays*; Os: *O.sativa*; At: *A.thaliana*;

图2 不同物种 B-ARR 进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of B-ARR in different species

遗传结构多样性是基因家族进化的主要来源。根据 B-ARR 家族基因的 CDS 和 gDNA 序列，利用 GSD S 在线网站绘制了其外显子-内含子结构图(图 3A)。结果显示，其内含子范围为 4~6，外显子范围为 5~7，外显子-内含子数目和结构相对保守。位于同一进化分支上的成员具有相似的基因结构，说明 B-ARR 家族成员的基因结构在进化上较为保守。

小麦 B-ARR 转录因子蛋白序列经 Pfam 分析结果显示，25 个 B-ARR 蛋白均含有响应调控接收结构域和 Myb-like DNA 结合域。为了进一步了解小麦 B-ARR 的结构多样性，我们利用在线工具 MEME 预测了 10 个保守基序(图 3B)。结果表明，10 个基序中 4 个高度保守，所有 B-ARR 成员均含有 motif 1(Myb-like DNA 结合域)和 motif 2、motif 3、motif 4 (响应调控接收结构域)。结合系统进化分析，同一进化分支上的 B-ARR 蛋白含有相似的基序，并且它们在基因功能上也可能具有相似性，例如，*TaARRM-like9*、*TaARRM-like10* 和 *TaARRM-like12* 的保守蛋白基序结构高度相似，均含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4 motif 5、motif 8 和 motif 10，说明这 3 个基因可能具有更相似的功能。此外小麦 B-ARR 蛋白中保守基序类型和数量的部分差异反映了这些蛋白的结构多样性，表明它们可能在小麦生长发育过程中具有不同的生物学功能。



A: 小麦 B-ARR 基因的外显子-内含子结构。内含子用黑线表示，外显子用灰色框表示，未翻译区用蓝色框表示。B: B-ARR 成员的保守蛋白基序结构。使用 MEME 识别出 10 种模式，并以不同颜色的框呈现。Motif 1 为 Myb-like DNA 结合域；Motif 2, 3, 4 为响应调控接收结构域

A: The exon-intron structures of wheat B-ARR genes. Introns were represented with black lines, exons were represented with gray boxes, and untranslated regions were represented with blue boxes. B: Architectures of the conserved protein motifs in TaB-ARR. Ten patterns were identified using the MEME program and were presented with boxes of different colors. Motif 1 was Myb-like DNA-binding domain and Motif 2, 3, 4 were Response regulator receiver domains

图 3 小麦 B-ARR 基因家族的基因结构和基序分析

Fig.3 Gene structure and motif analysis of B-ARR gene family in wheat

2.3 小麦 B-ARR 基因的染色体分布及共线性分析

利用 MapChart 把小麦的 25 个 B-ARR 基因定位于 12 条小麦染色体上。B-ARR 基因不均匀地分布在 A、B 和 D 亚基因组中，其中染色体 7A、7B 和 7D 均包含 4 个基因，染色体 3A、3B、6B 和 6D 包含 2 个基因，

染色体 3D、4A、4B、4D 和 6A 各自包含一个基因)。在小麦第 1、2、5 号染色体上未发现 B-ARR 基因，说明 B-ARR 基因家族在小麦染色体上分布不均匀。小麦 B-ARR 基因的同源基因拷贝数分析表明(图 4)，小麦基因组中存在 25 个 B-ARR 同源基因，它们均来源于片段重复，位于不同染色体上片段重复区域的保守位置，表明片段重复在小麦 B-ARR 基因的数量扩增中起着重要作用。B-ARR 家族的同源基因对的 Ka/Ks 值均小于 1，表明 B-ARR 基因均经过片段复制后的纯化选择，同时在小麦中具有保守的进化。

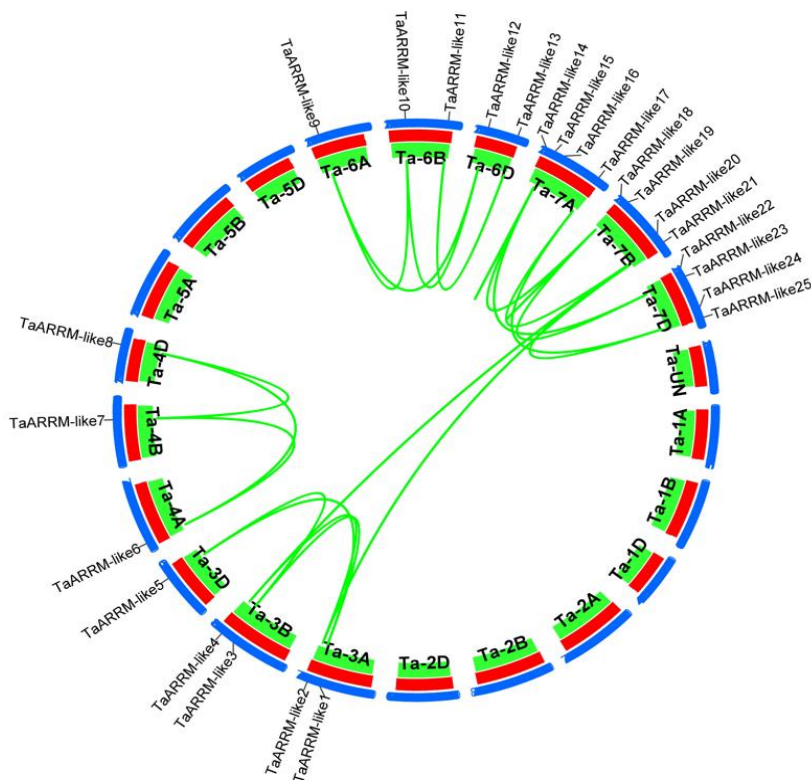


图 4 小麦 B-ARR 基因重复性分析

Fig.4 Replication event analysis of wheat B-ARR genes

为了研究小麦 B-ARR 基因家族的进化关系，利用 MscanX 软件对共线性分析结果进行可视化。我们选择乌拉尔图小麦(*Tu*)、拟斯卑尔脱山羊草(*As*)、圆锥小麦(*Tt*)和粗山羊草(*Aet*)以鉴定小麦(*Ta*)B-ARR 基因的直系同源基因对(图 5)。结果显示，在乌拉尔图小麦和拟斯卑尔脱山羊草与圆锥小麦(*Tu-Tt*, *As-Tt*)之间存在 10 和 16 个同源基因对；在圆锥小麦和粗山羊草与六倍体小麦(*Tt-Ta*, *Aet-Ta*)之间存在 42 和 20 个同源基因对。这表明小麦 B-ARR 基因在进化过程中随着倍性的增加拷贝数也随之增加，与小麦进化基本同步进行。

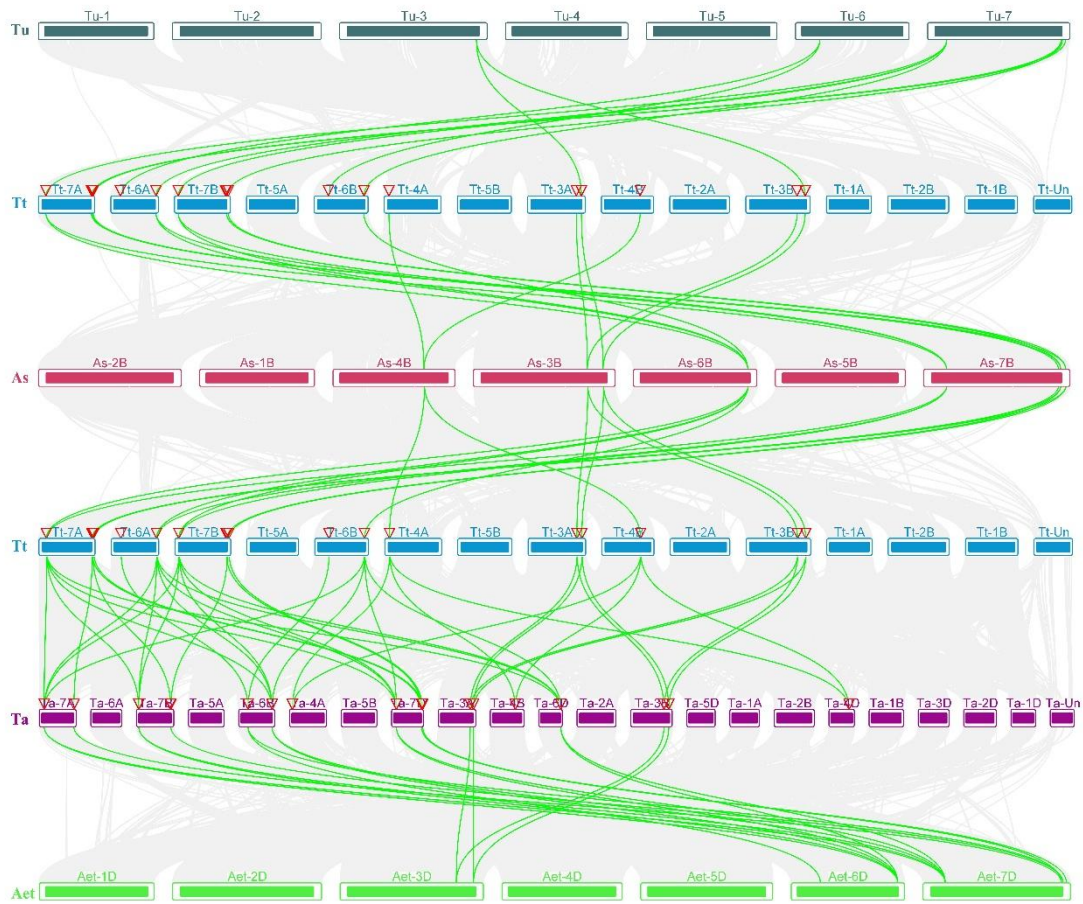


图 5 小麦 B-ARR 基因进化分析

Fig.5 Evolutionary analysis of wheat B-ARR genes

2.4 小麦 B-ARR 基因启动子的顺式作用元件分析和蛋白质互作网络分析

通过分析 B-ARR 基因上游 2000bp 启动子区，共鉴定出 46 个不同的顺式作用调控元件(图 6)，主要是与非生物胁迫和防御相关激素反应元件。其中，与胁迫相关的元件有光响应元件，如 AE-box、ATCT-motif、Sp1 等，以及与盐胁迫(LTR)、干旱响应(MBS)、厌氧应激(ARE、GC-motif)、伤害胁迫(WUN-motif)、防御和胁迫响应(TC-rich repeats)相关的顺式作用元件。大部分 B-ARR 基因的启动子包含调节激素反应的顺式作用元件，如参与脱落酸(ABA)反应的顺式作用元件(ABRE)，参与生长素(IAA)反应的顺式作用元件(AuxRR-core、TGA-element)，参与茉莉酸(JA)反应的顺式作用元件(CGTCA-motif、TGACG-motif)，参与赤霉素(GA)反应的顺式作用元件(GARE-motif、P-box、TATC-box)，参与水杨酸(SA)反应的顺式作用元件(TCA-element)等。除此之外，还包括一些与生长发育相关的顺式作用元件，如与种子特异性表达相关的顺式元件(RY-element)，与细胞周期调控相关的顺式作用元件(MSA-like)，与分生组织表达相关的顺式调节元件(CAT-box)等。综上所述，小麦 B-ARR 基因家族可能参与多种非生物胁迫、植物激素反应以及细胞生长发育的调控。

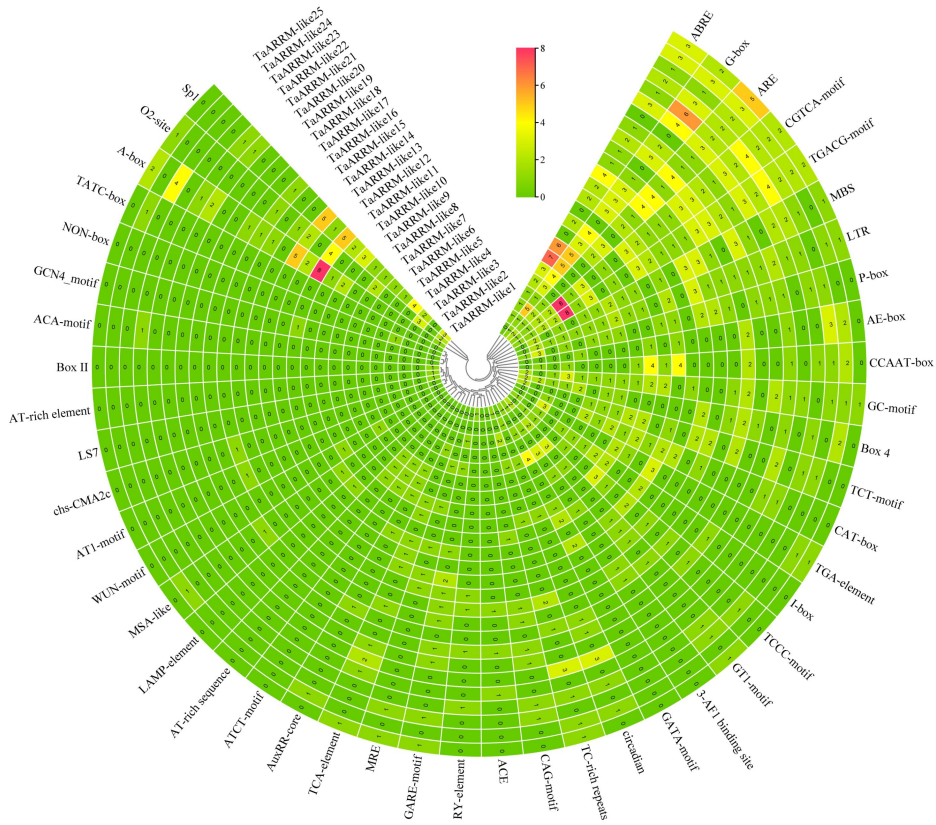


图 6 B-ARR 基因家族的顺式作用元件

Fig.6 *Cis*-acting elements (CAREs) of the B-ARR gene family

结合系统进化分析结果，利用 STRING 在线服务器(<http://version10.string-db.org/>)预测 B-ARR 的蛋白质互作网络，并使用软件 Cytoscape 进行可视化(图 7)。B-ARR 蛋白质之间存在着不同的调控通路，各基因之间相互影响，在小麦的生长发育过程中起着不可替代的作用。

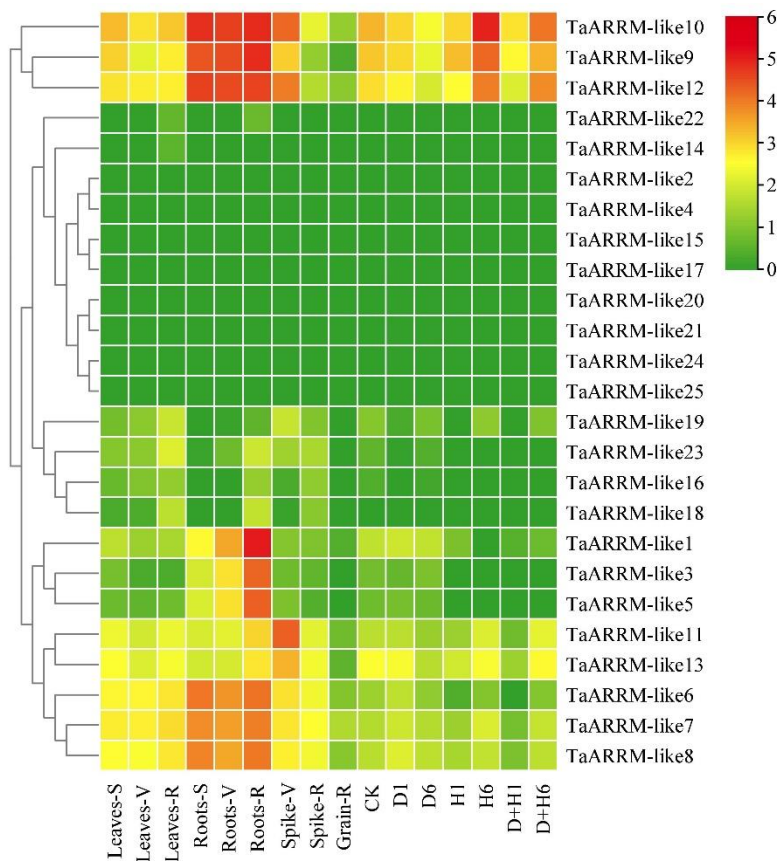


图 7 B-ARR 基因家族的蛋白质互作网络

Fig.7 Protein interaction networks of the B-ARR gene family

2.5 小麦 B-ARR 基因家族成员的表达模式分析

为了解 B-ARR 基因家族在不同生长发育阶段的组织表达特点以及对各种逆境胁迫的响应特征，利用 T btools 绘制了不同组织间的表达量热图(图 8)。结果表明，多数 B-ARR 基因在根部有较高的表达量，在籽粒中几乎不表达，这可能是由于 B-ARR 基因家族在小麦根部发育发挥重要作用，几乎不参与籽粒的发育。*TaARRM-like10*、*TaARRM-like11*、*TaARRM-like12* 和 *TaARRM-like13* 基因在穗部发育营养期的表达量高于其生殖期，这说明这四个基因在穗部发育期可能发挥作用。通过分析 B-ARR 基因家族在非生物胁迫下的表达量发现，*TaARRM-like9*、*TaARRM-like10* 和 *TaARRM-like12* 在干旱处理下表达量下调，在高温胁迫以及与干旱联合处理下表达量显著上调，表明这 3 个基因对热胁迫更加敏感，可能在热胁迫下发挥主要作用。



S:幼苗期; V:营养期; R: 生殖期, CK: 对照; D1、D6: 干旱处理 1、6 h; H1、H6: 高温处理 1、6 h; D+H1、D+H6: 在高温和干旱胁迫下处理时间为 1、6 h。红色或绿色代表每个样品中每个转录本的较高或较低的相对丰度

S: Seedling stage; V: Vegetative stage; R: Reproductive stage. CK: Control; D1, D6; Drought treatment of 1h and 6h; H1, H6: Heat treatment of 1 h and 6 h; D+H1, D+H6: Heat and drought treatments of 1h and 6h. The red and green colors represent the higher or lower relative abundance, respectively

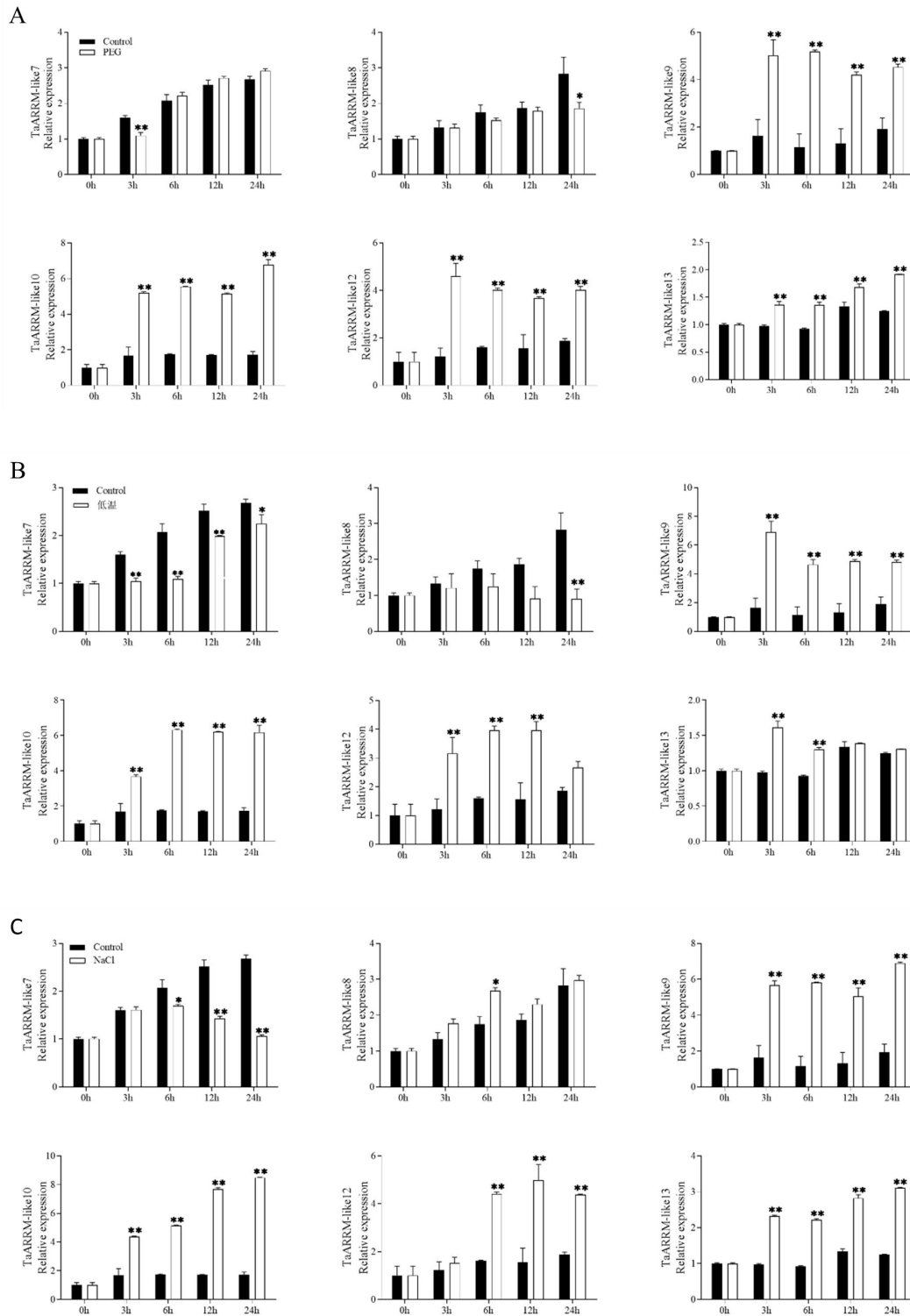
图 8 小麦 B-ARR 基因在不同组织和非生物胁迫中的表达谱分析

Fig.8 Expression profile analysis of B-ARR genes in different tissue and abiotic stress of wheat

2.6 小麦部分 B-ARR 基因在不同非生物胁迫条件下的表达分析

为了进一步了解小麦 B-ARR 基因家族在非生物胁迫下的潜在响应机制，我们分析了 6 个 B-ARR 基因在非生物胁迫(干旱、盐和低温处理)中的表达模式(图 9)。在干旱和低温处理下，基因 *TaARRM-like7* 和 *TaARRM-like8* 分别在胁迫 3h 和 24h 后表达量显著降低。基因 *TaARRM-like9*、*TaARRM-like10*、*TaARRM-like12* 和 *TaARRM-like13* 在干旱处理下表达量显著升高，其中基因 *TaARRM-like9*、*TaARRM-like10* 和 *TaARRM-like12* 表达量升高最为明显，基因 *TaARRM-like9* 和 *TaARRM-like10* 在胁迫处理后表达量较 CK 升高了三倍。在盐胁迫处理下，基因 *TaARRM-like7* 的表达量在处理 6h 后显著降低；基因 *TaARRM-like8*、*TaARRM-like9*、*T*

aARRM-like10、*TaARRM-like12* 和 *TaARRM-like13* 在盐胁迫处理下表达量显著升高，其中基因 *TaARRM-like8* 在盐胁迫 6h 后表达量显著升高，但在干旱和低温胁迫 24h 后其表达量显著降低。这表明 B-ARR 家族各基因对非生物胁迫的响应机制存在差异，但是大部分基因对不同非生物胁迫的响应机制相似。



*: 差异显著($P < 0.05$); **: 差异极显著($P < 0.01$)

*: Significant difference ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference ($P < 0.01$)

图 9 小麦 B-ARR 家族基因在 PEG(A)、低温(B)和 NaCl(C)处理下的表达水平分析 Fig.9 Analysis of expression levels of B-ARR family genes in wheat under PEG(A), low temperature and NaCl(C) treatment

3 讨论

ARR 基因最初被鉴定为原核生物中广泛存在的 His-Asp 磷酸化信号转导途径的关键组分^[30]。根据其保守结构域, ARR 基因分为 A 型和 B 型两大类^[31]。B-ARR 转录因子广泛存在于植物中, 在介导细胞分裂素信号转导中起着重要作用。除此之外, 在植物中, B 型 ARR 已被证明对 DNA 结合转录调节因子至关重要^[32]。随着生物信息学的发展, B-ARR 基因家族在拟南芥、水稻和玉米等中被鉴定^[33,34], 但在小麦中研究尚浅。本研究根据 B-ARR 蛋白均含有响应调控接收结构域和 Myb-like DNA 结合域, 共鉴定出 25 个家族成员。

亚细胞分布是蛋白质的重要特征, 因为蛋白质功能和其所处的位置密切相关, 来自主要亚细胞位置的蛋白质可以以超过 90% 的准确率相互区分^[35]。例如, 细胞核中的蛋白质主要参与基因转录和 DNA 修复。在这项研究中, 我们在小麦基因组中鉴定了 25 个 B-ARR 基因, 预测其编码蛋白都存在于细胞核中。

研究发现, 基因家族的进化和扩展与基因重复密切相关, 基因重复的发生可能是由于片段重复、串联重复或全基因组重复^[36-38]。一些重复基因对可能保留相似的功能并表现出彼此之间的部分或完全分歧^[39], 许多植物的转录因子家族都发生了基因重复事件。小麦的 B-ARR 家族基因不均匀地分布在 3 号、4 号、6 号和 7 号染色体上, 其中, 有 12 个基因都分布在 7 号染色体上。通过同源性分析, 小麦基因组中含有 52 对 B-ARR 同源基因, 都源于片段重复, 说明在小麦 B-ARR 基因家族的进化和扩展过程中, 片段复制可能具有主导作用。同时, 我们计算了 52 对 B-ARR 同源基因的 Ka/Ks 值, 其结果均小于 1, 说明 B-ARR 基因在长期进化中为纯化选择。已有研究表明, 六倍体面包小麦 (AABBDD) 是通过四倍体圆锥小麦 (AABB) 与含有 D 基因组的粗山羊草 (DD) 杂交产生的, 四倍体圆锥小麦 (AABB) 是通过二倍体乌拉尔图小麦 (AA) 和拟斯卑尔脱山羊草 (BB) 杂交产生的^[40]。本研究对 B-ARR 基因家族的进化分析表明 B-ARR 基因在小麦进化过程中一直存在, 因此我们推测杂交是造成六倍体小麦与圆锥小麦和粗山羊草之间有很多 B-ARR 直系同源基因对的部分原因。

通过对小麦 B-ARR 基因家族成员启动子顺式作用元件的分析, 可以进一步了解 B-ARR 基因的功能。有研究表明, LTR 元件在拟南芥盐胁迫中发挥重要作用^[41]。在各种作物抗旱性的研究中, 发现 MBS 元件普遍存在于抗旱相关基因的启动子序列中, 与干旱响应密切相关^[42]。B-ARR 基因家族中的大部分成员都含有干旱诱导顺式元件 MBS, 盐胁迫响应元件 LTR, 光响应元件 G-box、Box4 和应激反应元件 ARE (图 6), 这表明, B-ARR 基因家族在非生物胁迫中发挥作用。此外, 部分与激素相关的元件在 B-ARR 基因家族中存在的比率也很高, 例如, ABRE (脱落酸反应元件), P-box (赤霉素反应元件) 和 CGTCA-motif、TGACG-motif (茉莉酸反应元件)。茉莉酸信号分子参与植物生长发育众多生理过程的调控, 尤其是作为环境信号分子能有效地介导植物对生物及非生物胁迫的防御反应^[43]。这表明, B-ARR 基因家族可能在小麦生长发育过程和抗胁迫中发挥重要作用。

基因的组织表达模式往往与其基因功能密切相关。在小麦抵御非生物胁迫的反应过程中, 对 B-ARR 基因家族的了解很少。已有研究表明, 拟南芥 ARR1 基因在干旱胁迫中发挥作用^[44]; 拟南芥 ARR22 基因通过增强细胞膜完整性, 在逆境胁迫应答中发挥积极作用^[45]; 在橡胶树和桑葚中, B-ARR 转录因子家族参与低温胁迫反应^[46,47]。在本研究中, 基因 TaARRM-like9、TaARRM-like10、TaARRM-like12 和 TaARRM-like13 在干旱、盐和低温胁迫下显著上调, 表明大部分 B-ARR 基因在干旱、盐和低温胁迫下表现为正向调控; 同时发现基因 TaARRM-like7 和 TaARRM-like8 在干旱和低温胁迫下显著下调, 表明 B-ARR 基因家族成员对于非生物胁迫的调控机制不尽相同。

4 结论

综上所述, 本研究对小麦 B-ARR 基因家族的 25 个成员进行了鉴定, 并进行了全面系统的分析。这 25 个 B-ARR 基因分布在 12 条染色体上, 在系统发育上每一个分支的基因结构高度相似, 蛋白质基序高度保守。基因的进化分析表明 B-ARR 基因在进化过程中一直存在, 并不断分化。顺式作用元件和表达模式分析表明 B-ARR 基因家族可能参与多种胁迫反应。本研究结果有助于更好地理解小麦 B-ARR 基因家族的复杂

调控，也为小麦功能基因组学的进一步研究提供了有价值的信息。

参考文献：

- [1] Dong FS, Lv MY, Wang JP, Shi XP, Liang XX, Liu YW, Yang F, Zhao H, Chai JF, Zhou S. Transcriptome analysis of activated charcoal-induced growth promotion of wheat seedlings in tissue culture. *BMC Genetics*, 2020, 21(1): 69-79.
- [2] 于美, 唐华丽, 叶兴国. 利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(01): 102-116.
Yu M, Tang HL, Ye XG. Progresses on wheat improvement by using transgenic and genome editing technologies. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(01): 102-116.
- [3] Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B. PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 1-10.
- [4] Liu B, Sun Y, Xue J, Jia X, Li R. Genome-wide characterization and expression analysis of GRAS gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.). *PeerJ*, 2018, 6: e4796.
- [5] Song Y, Xuan A, Bu C, Ci D, Tian M, Zhang D. Osmotic stress-responsive promoter upstream transcripts (PROMPTs) act as carriers of MYB transcription factors to induce the expression of target genes in *Populus simonii*. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(1): 164-177.
- [6] Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P. Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(3): 585-596.
- [7] Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 3007-3018.
- [8] Mason MG, Jha D, Salt DE, Tester M, Hill K, Kieber JJ, Schaller GE. Type-B response regulators ARR1 and ARR12 regulate expression of *AtHKT1;1* and accumulation of sodium in *Arabidopsis* shoots. *The Plant Journal*, 2010, 64(5): 753-763.
- [9] Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmülling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 2005, 44(2): 314-333.
- [10] Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(3):814-819.
- [11] Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 2008, 322(5906): 1380-1384.
- [12] Werner T, Schmülling T. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009, 12(5): 527-538.
- [13] Zürcher E, Liu J, di Donato M, Geisler M, Müller B. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, 2016, 353(6303): 1027-1030.
- [14] Zubo YO, Schaller GE. Role of the cytokinin-activated type-B response regulators in hormone crosstalk. *Plants (Basel)*, 2020, 9(2): 166.
- [15] Xie M, Chen H, Huang L, O'Neil RC, Shokhirev MN, Ecker JR. A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1604.
- [16] Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 2001, 413(6854): 383-389.
- [17] Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294(5546): 1519-1521.
- [18] Mason MG, Li J, Mathews DE, Kieber JJ, Schaller GE. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 927-937.
- [19] Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, 2008, 20(8): 2102-2116.
- [20] Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(1): 47-57.
- [21] 巫燕飞, 胡琴, 周棋, 杜雪竹, 盛锋. 水稻延伸因子复合体家族基因鉴定及非生物胁迫诱导表达模式分析. *作物学报*, 2022, 48(03): 644-655.
Wu YF, Hu Q, Zhou Q, Du XZ, Sheng F. Genome-wide identification and expression analysis of Elongator complex family genes in response to abiotic stresses in rice. *The Crop journal*, 2022, 48(03): 644-655.

- [22] Woloszynska M, Le Gall S, Van Lijsebettens M. Plant Elongator-mediated transcriptional control in a chromatin and epigenetic context. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1859(8): 1025-1033.
- [23] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [24] Davidson R, Martín Del Campo A. Combinatorial and computational investigations of neighbor-joining bias. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 584785.
- [25] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [26] Wang Y, Tang H, Debarry JD, Tan X, Li J, Wang X, Lee TH, Jin H, Marler B, Guo H, Kissinger JC, Paterson AH. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [27] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He Y, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [28] Kang CH, Jung WY, Kang YH, Kim JY, Kim DG, Jeong JC, Baek DW, Jin JB, Lee JY, Kim MO, Chung WS, Mengiste T, Koiwa H, Kwak SS, Bahk JD, Lee SY, Nam JS, Yun DJ, Cho MJ. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13(1): 84-95.
- [29] Bhattacharya M, Hota A, Kar A, Sankar Chini D, Chandra Malick R, Chandra Patra B, Kumar Das B. In silico structural and functional modelling of Antifreeze protein (AFP) sequences of Ocean pout (*Zoarces americanus*, Bloch & Schneider 1801). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(2): 721-730.
- [30] Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T. Histidine-containing phosphotransfer (Hpt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(12): 1258-1268.
- [31] Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(7): 733-742.
- [32] Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T. Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(1): 28-39.
- [33] Hosoda K, Imamura A, Katoh E, Hatta T, Tachiki M, Yamada H, Mizuno T, Yamazaki T. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *The Plant Cell*, 2002, 14(9): 2015-2029.
- [34] Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hdl*. *Genes & Development*, 2004, 18(8): 926-936.
- [35] Zeng J, Zhu X, Haider MS, Wang X, Zhang C, Wang C. Genome-wide identification and analysis of the type-B authentic response regulator gene family in peach (*Prunus persica*). *Cytogenetic and Genome Research*, 2017, 151(1): 41-49.
- [36] Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 1-21.
- [37] Lawton-Rauh A. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 396-409.
- [38] Moore R, Purugganan M. The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(26): 15682-15687.
- [39] Pickett FB, Meeks-Wagner DR. Seeing double: appreciating genetic redundancy. *The Plant Cell*, 1995, 7(9): 1347-1356.
- [40] Dubcovsky J, Dvorak J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 2007, 316(5833): 1862-1866.
- [41] 张新宇, 赵兰杰, 李艳军, 孙杰, 刘永昌. 盐胁迫对拟南芥 *AtPUB18* 基因的诱导表达及其启动子分析. *西北植物学报*, 2014, 34(01): 54-59.
Zhang XY, Zhao LJ, Li YJ, Sun J, Liu YC. Expression of *AtPUB18* after salt stress treatment and analysis of its promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(01): 54-59.
- [42] Yusuf CYL, Abdullah JO, Shaharuddin NA, Abu Seman I, Abdullah MP. Characterization of promoter of *EgPAL1*, a novel *PAL* gene from the oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(2): 265-278.
- [43] 李梦莎, 阎秀峰. 植物的环境信号分子茉莉酸及其生物学功能. *生态学报*, 2014, 34(23): 6779-6788.
Li MS, Yan XF. Jasmonic acid signaling in plants and its biological functions in relation to environment. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(23): 6779-6788.
- [44] Nguyen KH, Ha CV, Nishiyama R, Watanabe Y, Leyva-González MA, Fujita Y, Tran UT, Li W, Tanaka M, Seki M, Schaller GE, Herrera-Estrella L, Tran LS. *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(11): 3090-3095.

- [45] Kang NY, Cho C, Kim J. Inducible expression of *Arabidopsis* response regulator 22 (ARR22), a type-C ARR, in transgenic *Arabidopsis* enhances drought and freezing tolerance. PLoS ONE, 2013, 8(11): e79248.
- [46] Gong XX, Yan BY, Hu J, Yang CP, Li YJ, Liu JP, Liao WB. Transcriptome profiling of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) discovers candidate regulators of the cold stress response. Genes & Genomics, 2018, 40(11): 1181-1197.
- [47] Peng X, Wu Q, Teng L, Tang F, Pi Z, Shen S. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 1-14.